



Bel BioLab

Протокол реакции обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени с использованием Diamant RevertP Полимеразы (One-Step RT-PCR).

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
10-кратный буфер TG	2,5	1-кратный
Прямой праймер (50 μM)	0,2	0,4 μM*
Обратный праймер (50 μM)	0,2	0,4 μM*
Двумеченный зонд (50 μM)	0,1	0,2 μM
РНК матрица	Определяется пользователем	1 pg –10 ng РНК
дНТФ 2 mM	2,5	0,2 mM
Diamant RevertP Полимераза (10 U/μl)	0,05	0,02 U/μl
Hot-start Taq- (5 U/μl)*	0,2 - 0,4	0,04 - 0,08 U/μl
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

*– Фермент должен быть неактивным при 55 С в течение 15 минут.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.

3. Условия проведения РТ-ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Ревертирование	55°C*	15 мин
Начальная денатурация	95°C**	5 мин
40-50 циклов	95°C	15 секунд
	60°C (детекция)	30 секунд
	67°C	15 секунд.
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

*Фермент **Diamant RevertP** проявляет максимальную активность при 72-77°C. Использование данной температуры для ревертирования ограничивается Taq-полимеразой (не должна активироваться при данных температурах) и олигонуклеотидами (должны иметь высокий T_m).

** Уменьшение времени денатурации может привести к ингибированию ПЦР за счет наличия вытесняющей активности у фермента **Diamant RevertP**.